

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 04-099481

(43)Date of publication of application : 31.03.1992

(51)Int.Cl.

C12N 1/20
A61K 35/74
A61K 39/39
//(C12N 1/20
C12R 1:01)

(21)Application number : 02-218599

(71)Applicant : CHIBA SEIFUN KK

MIZUNO DENICHI

SOMA GENICHIRO

(22)Date of filing : 20.08.1990

(72)Inventor : SOMA GENICHIRO

YOSHIMURA ATSUSHI

TSUKIOKA DAISUKE

MIZUNO DENICHI

OSHIMA HARUYUKI

(54) NOVEL BACTERIUM, NOVEL LPS, NOVEL IMMUNOFUNCTION-ACTIVATING AGENT, NEW
IMMUNOFUNCTION-ACTIVATING AGENT FOR ANIMAL

(57)Abstract:

NEW MATERIAL: A LPS-producing gram negative short Bacillus bacterium(FERN P-3509). Shape: short culmed shape, not moving and negative to Gram stain; growth state: forms a yellow-beamy round and opaque colony in the standard agar medium; physiological properties: positive Voges-Proskauer reaction, O-F test, etc., and negative to indole-producing reaction. etc.; the utilization of carbon sources: utilizes lactose, rhamnose, etc., not utilize adonite, inositol, etc. SE: A bacterium for producing a novel LPS which is an active ingredient for immunofunction-activating agents for animals.

PREPARATION: Wheat flour is mixed with distilled water, cultured with shaking at 37° C, diluted, spread on a standard agar medium and subsequently cultured. A colony producing the LPS is screened from the colonies thus produced by a test.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Date of final disposal of application other than
examiner's decision of rejection or
application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平4-99481

⑬ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成4年(1992)3月31日

C 12 N 1/20
A 61 K 35/74
39/39
//C 12 N 1/20
C 12 R 1:01)

ABD A 7236-4B
AER A 9165-4C
8829-4C

審査請求 未請求 請求項の数 12 (全14頁)

⑮ 発明の名称 新規細菌、新規LPS、新規免疫機能活性化剤、新規動物用免疫機能活性化剤

⑯ 特 願 平2-218599

⑰ 出 願 平2(1990)8月20日

⑱ 発 明 者 杉 源 一 郎 東京都世田谷区東玉川1-10-21
⑱ 発 明 者 吉 村 淳 千葉県千葉市磯辺3-26-7
⑱ 発 明 者 月 岡 大 輔 千葉県千葉市春日1-21-17
⑱ 発 明 者 水 野 伝 一 神奈川県鎌倉市岡本18
⑱ 発 明 者 大 島 治 之 東京都八王子市館町1097 館ヶ丘団地2-10-513
⑲ 出 願 人 千葉製粉株式会社 千葉県千葉市新港17番地
⑲ 出 願 人 水 野 伝 一 神奈川県鎌倉市岡本18
⑲ 出 願 人 杉 源 一 郎 東京都世田谷区東玉川1-10-21

明 細 書

が、高層部は変化する。
ガスを生成する。

1 発明の名称

新規細菌、新規LPS、新規免疫機能活性化剤、新規動物用免疫機能活性化剤

2 特許請求の範囲

(1) 次の性質を有するLPS産生グラム陰性桿状菌。

(a) 形態

- ① 桿状
- ② 運動性なし
- ③ グラム染色性：-

(b) 生育状態

- ① 標準寒天培地：黄〜クリーム色で丸形の不透明なコロニーを形成する。
- ② S S 寒天培地：白色で半透明なコロニーを形成する。
- ③ T S I 寒天培地：斜面部での変化はない

(c) 生理的性質

- ① フォーゲス・プロスカウエル反応：+
- ② インドールの生成：-
- ③ 硫化水素の生成：-
- ④ クエン酸の利用：+
- ⑤ ウレアーゼ：-
- ⑥ オキシダーゼ：-
- ⑦ O-Fテスト：+

(d) 炭素源の利用性

- ① ラクトース：+
- ② アドニット：-
- ③ ラムノース：+
- ④ マンニット：+
- ⑤ エスクリン：+
- ⑥ イノシット：-
- ⑦ ソルビット：+
- ⑧ アラビノース：+
- ⑨ ラフィノース：+

④ シュクロース：＋

(e) その他

① リジンの脱炭酸反応：－

② マロン酸の利用：－

③ アルギニンの分解：－

④ フェニルアラニンの脱アミノ化反応：－

⑤ オルニチンの脱炭酸反応：－

(2) 次の性質を有するLPS産生グラム陰性桿状菌。

(a) 形態

① 桿状

② 運動性なし

③ グラム染色性：－

(b) 生育状態

① 標準寒天培地：クリーム色で不透明なコロニーを形成する。

② SS寒天培地：赤色で不透明なコロニーを形成する。

③ TSI寒天培地：斜面部での変化はないが、高層部は黄変する。

(e) その他

① リジンの脱炭酸反応：－

② マロン酸の利用：＋

③ アルギニンの分解：＋

④ フェニルアラニンの脱アミノ化反応：－

⑤ オルニチンの脱炭酸反応：＋

(3) 次の性質を有するLPS産生グラム陰性桿状菌。

(a) 形態

① 桿状

② 運動性なし

③ グラム染色性：－

(b) 生育状態

① 標準寒天培地：黄色で丸形の半透明なコロニーを形成する。

② SS寒天培地：コロニーを形成しない。

③ TSI寒天培地：斜面部での変化はないが、高層部は黄変する。ガスを生じない。

(c) 生理的性質

ガスを生成する。

(c) 生理的性質

① フォーゲス・プロスカウエル反応：＋

② インドールの生成：－

③ 硝化水素の生成：－

④ クエン酸の利用：＋

⑤ ウレアーゼ：－

⑥ オキシダーゼ：－

⑦ O-Fテスト：＋

(d) 炭素源の利用性

① ラクトース：＋

② アドニット：－

③ ラムノース：＋

④ マンニット：＋

⑤ エスクリン：＋

⑥ イノシット：－

⑦ ソルビット：＋

⑧ アラビノース：＋

⑨ ラフィノース：＋

⑩ シュクロース：＋

① フォーゲス・プロスカウエル反応：＋

② インドールの生成：－

③ 硝化水素の生成：－

④ クエン酸の利用：＋

⑤ ウレアーゼ：－

⑥ オキシダーゼ：－

⑦ O-Fテスト：＋

(d) 炭素源の利用性

① ラクトース：＋

② アドニット：－

③ ラムノース：＋

④ マンニット：＋

⑤ エスクリン：＋

⑥ イノシット：－

⑦ ソルビット：＋

⑧ アラビノース：＋

⑨ ラフィノース：＋

⑩ シュクロース：＋

(e) その他

① リジンの脱炭酸反応：－

②マロン酸の利用：+

③アルギニンの分解：-

④フェニルアラニンの脱アミノ化反応：-

⑤オルニチンの脱炭酸反応：-

(4) 次の物性を有する、請求項1記載の細菌に由来するLPS。

分子量：5,000±1,000 (SDS電気泳動法)

リン数：2±1/分子量5,000

ヘキサミン数：9±1/分子量5,000

KDO数：2±1/分子量5,000

(5) 次の物性を有する、請求項2記載の細菌に由来するLPS。

分子量：6,500±2,500 (SDS電気泳動法)

リン数：1~2/分子量5,000

ヘキサミン数：7±1/分子量5,000

KDO数：1~2/分子量5,000

(6) 次の物性を有する、請求項3記載の細菌に由来するLPS。

3 発明の詳細な説明

[産業上の利用分野]

本発明は、新規な細菌、新規なLPS、新規な免疫機能活性化剤、新規な動物用免疫機能活性化剤に関する。

より詳細には、本発明は、3種の新規なブドウ糖発酵性のグラム陰性短桿菌、それに由来する新規なLPS、及びそれらLPSを含む経口、静注、経皮投与可能な新規な免疫機能活性化剤、動物用免疫機能活性化剤に関する。

[従来の技術]

生物には、生体の内部環境が外来性及び内因性の異物によって擾乱されるのを防ぎ、生体の恒常性を維持するための免疫機能が備わっている。従って、免疫機能の低下は健康の悪化、各種疾病の発病、老化促進の原因となり、その活性化は健康向上、各種疾病の発病阻止、治療、老化防止につ

分子量：6,500±2,500 (SDS電気泳動法)

リン数：2±1/分子量5,000

ヘキサミン数：5±1/分子量5,000

KDO数：2±1/分子量5,000

(7) 請求項4記載のLPSを含む免疫機能活性化剤。

(8) 請求項5記載のLPSを含む免疫機能活性化剤。

(9) 請求項6記載のLPSを含む免疫機能活性化剤。

(10) 請求項4記載のLPSを含む動物用免疫機能活性化剤。

(11) 請求項5記載のLPSを含む動物用免疫機能活性化剤。

(12) 請求項6記載のLPSを含む動物用免疫機能活性化剤。

ながる。

このため、免疫機能を活性化させる物質の提供が要請されており、現在、PSK[別名クレステン(興羽化学株式会社の登録商標)]、レンチナン(味の素株式会社の登録商標)、ベスタチン(日本化薬株式会社の登録商標)、ソニフィラン(科研製薬株式会社の登録商標)、OK-432[キャンサーケモセラピーレポートトット1(Cancer Chemotherapy Reports Part 1), vol. 68, No. 1, 10頁(1972)、別名ビシバニール(中外製薬株式会社の登録商標)]等が知られている。

[発明が解決しようとする課題]

従来の免疫機能活性化剤のうちで、PSK、レンチナン、ベスタチン、ソニフィランにはTNF産生能がないので、それらの免疫機能活性化能は低い。

一方、OK-432にはTNF産生能があるが、

大量投与が必要であることから、発熱、悪寒、血圧低下、血小板減少等の副作用の発生が避けられず、従って化学療法係数が小さい。更に、簡便な経口投与や経皮投与では効果がないので、投与上の便宜に欠ける。

ここで「TNF」とは、マクロファージにより産生される腫瘍障害因子(Tumor Necrosis Factor)の総称[ザジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー(The Journal of Biol. Chem., 260, 2345~2354頁(1985年)]であり、マクロファージの活性が高まるにつれてその産生量は増していく。「マクロファージ」は、免疫担当細胞の一種であり、動物体内のほとんど全ての組織に分布し、粒子状の異物や体内の老廃細胞などを捕食して消化する大型のアメーバ状細胞の総称である。

本発明は、これら従来技術の欠点に鑑み、新たな免疫機能活性化剤、動物用免疫機能活性化剤を提供するために創案されたものである。

小麦粉の名称	産地
①ダーク・ノザン・スプリングス	米国
②I・カナディアン・ホワイト	カナダ
③ハード・レッド・ウィンター・セミハード	米国
④オーストラリアン・スタンダード・ホワイト	オーストラリア
⑤ホロシリ	日本

LPSの分離

上記細菌から本発明のLPSを分離するには、ウェストファル(Westphal)等が「インメソツズ イン カーボハイドレート ケミストリー(In Methods in Carbohydrate Chemistry)のvol. V[米国ニューヨークのアカデミックプレス(Academic Press)社が1985年に発行]の83頁に記載した飽和フェノール法を用い、更に、陰イオン交換樹脂で精製すればよい。

即ち、本発明は、高い免疫機能活性化能を持つ新規な免疫機能活性化剤、動物用免疫機能活性化剤を提供すること、及び、その活性成分である新規なLPSを提供すること、及び、そのLPSの供給源となる新規な細菌を提供することを目的とする。

本発明のLPSは、各別に使用できることはもちろん、その意図される用途が阻害されない限り、それらの2種以上を任意に組み合わせ、又、更には他のいずれの物質とも組み合わせ使用できる。

[課題を解決するための手段]

細菌分離源

本発明の3種の細菌は、本発明者等が検討した小麦からはその産地、種類を問わず分離されている。従って、いずれの産地、種類の小麦及びその加工品からも分離されると推定される。本発明者等がそれら3種の細菌を分離できることを確認した小麦粉の産地、種類は次の通りである。

即ち、菌体を蒸留水に懸濁した後、蒸留水と等容量の飽和フェノールと共に攪拌し、次いで、遠心分離により水層を回収し、この水層を透析に付してフェノールを除去し、限外濾過により濃縮して粗LPS画分を得、この画分を常法に従って、例えば、ファルマシア社製のPPLCシステムでファルマシア社製のモノQセファロース(Sephharose)、Qセファロース(Sephharose)を使用して陰イオン交換クロマトグラフィーに付して精製し、更に、常法に従って脱塩すればよい。

以上の操作により、純度96%以上の精製製品が得られる。

LPSの物性

従って実施例中で詳述する如く、本発明の3種のLPS(96%以上純度製品)の物性は次の通りであった。

①分子量: $5,000 \pm 1,000$ (SDS電気泳動法)

リン数：2±1／分子量5,000
ヘキソサミン数：9±1／分子量5,000
KDO数：2±1／分子量5,000
②分子量：6,500±2,500(SDS電気泳動法)

リン数：1～2／分子量5,000
ヘキソサミン数：7±1／分子量5,000
KDO数：1から2／分子量5,000
③分子量：6,500±2,500(SDS電気泳動法)

リン数：2±1／分子量5,000
ヘキソサミン数：5±1／分子量5,000
KDO数：2±1／分子量5,000

提供の形態

本発明のLPSはそのまま、或いは任意の程度に濃縮した形で提供できる。又、保存性を高めるために、凍結乾燥や噴霧乾燥などの任意の手段により乾燥粉末として提供することもできる。これらはいずれも常法で生産できる。

剤)である。

TNF活性は、L-929細胞[プロシーディング オブ ナショナル アカデミー サイエンス オブ ユーエスエー 72、3666～3670頁]に対する細胞毒性を基にして、次のようにして測定する。

L929細胞を、5%仔牛胎児血清を加えたイーグルミニマムエッセンシャル培地(以下、MEM培地と表す)で育成し、 8×10^4 個の細胞が100 μ lの同上培地に含まれる様にし、96穴の平底プレートで育種する。育種条件は37℃、2時間、5%CO₂、100%H₂Oであり、通常の細胞培養に用いられる方法でよい。その後、アクトノマイシンDを培地中に終濃度1 μ g/mlとなるように加え、培養液の量を150 μ lとする。即座に、検体を適当にMEM培地で希釈したものを50 μ l加える(この希釈率を適宜調整し、ED₅₀を求める事ができる)。更に、最終濃度200 μ lとなったL929細胞を上記条件で18時間培養する。

免疫活性化能の測定

本発明のLPSの免疫活性化能は、マクロファージ活性を通じての内因性TNF産生能により確認した。

内因性TNF産生能

動物体内にTNFを産生させるためには、産生前駆(プライミング)段階と産生開始(トリガリング)段階とが必要であることは、カーズウェル(Carswell)らにより、プロシーディング オブ ナショナル アカデミー サイエンス オブ ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) 72、3666～3670頁(1975年)に報告されており、その後、各段階で使用出来る薬剤の検討もすすめられている。プライミング段階開始のために投与される薬剤が「プライマー」(内因性TNF産生促進剤)であり、トリガリング段階開始のために投与される薬剤が「トリガー」(内因性TNF産生

細胞障害活性を測定するには、まず全培地を除去し、ついでC、1%クリスタルバイオレットを含む1%メチルアルコール溶液を加えて固定染色する。クリスタルバイオレットは全有核細胞を染色するが、死細胞は染色後にプレート底面より水洗で除去されるので、生存細胞の結果から細胞障害活性を直接測定できる。この染色度をOD₅₅₀での吸光度を指標として測定し、対照群に対する染色度と比較する事で細胞障害活性を測定する。活性の定義は次の様に行う。

L929細胞が50%生存できる検体の稀釈率(N)を求める。対照としてウサギTNS[腫瘍障害血清(Tumor Necrosis Serum)]を使用し、このウサギTNSの活性n(単位/ml)を 2.4×10^5 単位/mg/mlのTNF- α を用いて決定する。このウサギTNSのED₅₀を与える稀釈率(C)を求める。

検体活性(単位/ml)は $\frac{N}{C} \times n$ で計算する。

L P S の用途

本発明のL P Sは様々な用途に使用できる。

一つの用途は、その免疫機能活性化能をそのまま生かした免疫機能活性化剤、動物用免疫機能活性化剤である。

第2の用途は、その免疫機能活性化能を指標にして人間その他の動物の免疫機能をチェックするための免疫機能検査薬、動物用免疫機能検査薬である。

第3の用途は、その免疫機能活性化能の発現を期待して配合される医薬部外品、化粧品、食品、機能性食品、飲料、飼料等である。

提供できる剤の製造方法

これら免疫機能活性化剤等のいずれもが常法で製造できる。例えば、免疫機能活性化剤、動物用免疫機能活性化剤は医薬或は動物薬製造の常法に従って、錠剤として、或いは注射液、筋注薬として単独で、或いは他薬との配合物として処方できる。又、皮膚にはマクロファージが多いので、

1 L中	酵母エキス	2.5 g
	ペプトン	5.0 g
	ブドウ糖	1.0 g
	カンテン	15.0 g
pH	7.1 ± 0.1	

④菌類が異なると考えられた、培養経過時間8時間目、10時間目に認められた黄〜クリーム色不透明コロニー(コロニー1)、クリーム色不透明コロニー(コロニー2)、黄色半透明コロニー(コロニー3)、乳白色不透明コロニー(コロニー4)、白色不透明な小さなコロニー(コロニー5)を上記と同様の別の標準寒天培地にまき、補え過ぎ、一方で、コロニー1〜5の菌のグラム染色性、リムラス活性を調べた。ここで「リムラス活性」とは、1968年にレヴィン(Levin)により創案された、カプトガニ血球抽出液と発色合成基質を用いたエンドトキシン定量法であるリムラステストで陽性を示すことをさす。このリムラステストはL P S検出法として知られてお

皮膚塗布剤として投与するとより高い効果が得られる。

以下、実施例、実験例により本発明を更に詳細に説明する。

実施例1

①50 mLコーニングチューブに、1.09%の灰分を含む硬質小麦粉(カナダ産の1・カナデイアン・ホワイト)1.04 gを秤量して入れ、20 mLの蒸留水を加えて50 mL/gの小麦粉液を調製した。

②この液を37℃の水浴中で揺とう培養し、経過時間0時、1時、2時、3時、4時、6時、8時、10時、12時、20時、24時、45時に各0.5 mLを採取し、10³〜10⁵倍希釈して、標準寒天培地(日水製薬社製の培地であり、下記の組成を持つ)に100 μL宛をまき込み、生菌数の測定、コロニーの観察を行った。

標準寒天培地(コード05618)

り、例えば、生化学工業株式会社からトキシカラースystemという名称で市販されている試薬セットを使用して実施できる。

上記コロニーのうち、コロニー4及びコロニー5(共にグラム染色性+)のリムラス活性はコロニー1〜3(共にグラム染色性-)に比べて極めて低かったので、以後の検討から除き、日水製薬社製の培地及びIDテスト・EB-20を使用して、コロニー1〜3の形態、生化学的性状を観察した。次の結果が得られた。

コロニー1を形成する菌(900814-1)

(微生物研究第11664号として平成2年8月20日から通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されている)

(a)形態

①短棒状

②運動性なし

③グラム染色性:-

(b)生育状態

① 標準寒天培地：黄〜クリーム色で丸形の
不透明なコロニーを形成
する。

② S S 寒天培地：白色で半透明なコロニー
を形成する。

[S S 寒天培地：日水製薬コード 05031]

組成 1A 中	肉エキス	5.0 g
	酵母粉	9.0 g
	ペプトン	7.5 g
	ラクトース	10.0 g
	クエン酸ナトリウム	8.5 g
	チオ硫酸ナトリウム	5.5 g
	クエン酸第二鉄	1.0 g
	ニュートラルレッド	0.025 g
	ブリアントグリーン	0.033 g
	カンテン	13.5 g

pH 7.1 ± 0.1

③ T S I 寒天培地：斜面部での変化はない
が、高層部は黄変する。
ガスを生成する。

[T S I 寒天培地：日水製薬コード 05103]

組成 1A 中	肉エキス	5.0 g
	N a C l	5.0 g
	ペプトン	15.0 g
	ラクトース	10.0 g
	シュクロース	10.0 g
	ブドウ糖	1.0 g
	クエン酸第二鉄	0.2 g
	チオ硫酸ナトリウム	0.2 g
	フェノールレッド	0.02 g
	カンテン	15.0 g

pH 7.6 ± 0.1

(c) 生理的性質

- ① フォーゲス・プロスカウエル反応：+
- ② インドールの生成：-
- ③ 硫化水素の生成：-
- ④ クエン酸の利用：+
- ⑤ ウレアーゼ：-
- ⑥ オキシダーゼ：-
- ⑦ O - F テスト：+

(d) 炭素源の利用性

- ① ラクトース：+
- ② アドニット：-
- ③ ラムノース：+
- ④ マンニット：+
- ⑤ エスクリン：+
- ⑥ イノシット：-
- ⑦ ソルビット：+
- ⑧ アラビノース：+
- ⑨ ラフィノース：+
- ⑩ シュクロース：+

(e) その他

- ① リジンの脱炭酸反応：-
- ② マロン酸の利用：-
- ③ アルギニンの分解：-
- ④ フェニルアラニンの脱アミノ化反応：-
- ⑤ オルニチンの脱炭酸反応：-

コロニー 2 を形成する細菌 (900814-2)

(微生物研究第 11665 号として平成 2 年 8 月

20 日から通商産業省工業技術院微生物工業技術
研究所に寄託されている)

(a) 形態

- ① 短棒状
- ② 運動性なし
- ③ グラム染色性：-

(b) 生育状態

- ① 標準寒天培地：クリーム色で不透明なコ
ロニーを形成する。
- ② S S 寒天培地：赤色で不透明なコロニー
を形成する。
- ③ T S I 寒天培地：斜面部での変化はない
が、高層部は黄変する。
ガスを生成する。

(c) 生理的性質

- ① フォーゲス・プロスカウエル反応：+
- ② インドールの生成：-
- ③ 硫化水素の生成：-
- ④ クエン酸の利用：+
- ⑤ ウレアーゼ：-

⑤ オキシダーゼ：-

⑦ O-Fテスト：+

(d)炭素源の利用性

① ラクトース：+

② アドニット：-

③ ラムノース：+

④ マンニット：+

⑤ エスクリン：+

⑥ イノシット：-

⑦ ソルビット：+

⑧ アラビノース：+

⑨ ラフィノース：+

⑩ シュクロース：+

(e)その他

① リジンの脱炭酸反応：-

② マロン酸の利用：+

③ アルギニンの分解：+

④ フェニルアラニンの脱アミノ化反応：-

⑤ オルニチンの脱炭酸反応：+

⑤ ウレアーゼ：-

⑥ オキシダーゼ：-

⑦ O-Fテスト：+

(d)炭素源の利用性

① ラクトース：+

② アドニット：-

③ ラムノース：+

④ マンニット：+

⑤ エスクリン：+

⑥ イノシット：-

⑦ ソルビット：+

⑧ アラビノース：+

⑨ ラフィノース：+

⑩ シュクロース：+

(e)その他

① リジンの脱炭酸反応：-

② マロン酸の利用：+

③ アルギニンの分解：-

④ フェニルアラニンの脱アミノ化反応：-

⑤ オルニチンの脱炭酸反応：-

コロニー3を形成する細菌(900814-3)

(微工研菌第11666号として平成2年8月20日から通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されている)

(a)形態

① 短桿状

② 運動性なし

③ グラム染色性：-

(b)生育状態

① 標準寒天培地：黄色で丸形の半透明なコロニーを形成する。

② SS寒天培地：コロニーを形成しない。

③ TSI寒天培地：斜面部での変化はないが、高層部は黄変する。ガスを生成しない。

(c)生理的性質

① フォーゲス・プロスカウエル反応：+

② インドールの生成：-

③ 硫化水素の生成：-

④ クエン酸の利用：+

④ コロニー1、2、3をそれぞれ1mlのL-肉汁培地[Difco(ディフコ)社のポリバプトン10g、同社の酵母エキス5g、和光純薬社の特級NaCl5gを蒸留水に入れ、NaOHでpH7.5に合わせ、オートクレープし、別途、予め調製しておいた和光純薬社の特級グルコースの40%溶液を400倍に希釈して加えて調製]に移し、37℃で一夜振とうし、5.000g、4℃で20分間遠心処理して集菌した。

⑤ 各菌体をそれぞれ50mlの蒸留水に懸濁し、これに50mlの90%熱フェノールを加えて65~70℃で20分間攪拌し、冷却後に、10,000g、4℃で20分間遠心処理して、水層を回収した。フェノール層を更に2回上記と同一の操作に付した。3つの水層を合わせ、一夜透析してフェノールを除去し、内液を、アドヴァンテック・トヨー(ADVANTEC TOYO)社のUK-200を使用して膜外濾過に付して分子量20万カット・オフにより濃縮した(N₂圧：

2気圧)。

⑤この菌體サンプルを、ファルマシア社製のQ-セファローズ ファスト フロー (Q-Sepharose Fast Flow) を使って陰イオン交換クロマトグラフィーに付した。即ち、10 mM トリス-HCl (pH 7.5) と 10 mM の NaCl を含む緩衝液で試料をカラムに付した後、400 mM NaCl / 10 mM トリス-HCl (pH 7.5) でリムラス活性画分を溶出させた。この溶出液を上記と同じ条件で限外濾過に付して脱塩、濃縮して、純度95%以上のLPSを得た。なお、核酸は1M NaCl / 10 mM トリス-HCl (pH 7.5) で溶出した。

各画分の結果は次表1~3の通りであった。なお、LPS量は、リムラステストによる大腸菌LPS換算値であり、糖はフェノール-硫酸法で、蛋白はローリー法で測定した。又、核酸量はOD₂₆₀での測定値に基づき(1 OD = 50 μg)、純度(%)は次式に基づいて計算した。

$$\text{純度} = \frac{\text{乾燥収量} - (\text{蛋白量} + \text{核酸量})}{\text{乾燥収量}} \times 100$$

表 3

菌体 900814-3

総乾燥収量 (mg)	19.2
LPS (mg)	103.6
糖 (mg)	7.6
蛋白 (μg)	73
核酸 (μg)	< 137
純度 (%)	99<

⑥ 分子量

各LPSを蒸留水に溶解して1 mg/ml溶液を調製し、その4 μlを1.5 mlのトレフチューブに入れた。これに、別途、1 mMのEDTAに2.5% SDS、5%メルカプトエタノール、10 mM トリス塩酸 (pH 8.0) を加えて調製したSDS処理液1 μlを加え、この混液を3分間沸騰水に浸した。ファルマシア社製のファストシステム (Phast System) を使用し、電極との間にSDS-バッファー ストリップ

乾燥収量

表 1

菌体 900814-1

総乾燥収量 (mg)	8.8
LPS (mg)	19.8
糖 (mg)	3.1
蛋白 (μg)	86
核酸 (μg)	< 181
純度 (%)	96<

表 2

菌体 900814-2

総乾燥収量 (mg)	10.4
LPS (mg)	75.6
糖 (mg)	2.5
蛋白 (μg)	84
核酸 (μg)	< 108
純度 (%)	98<

(Buffer Strip) (ファルマシア社製) が介在せられた1 μlの上記混液をゲル [ファルマシア社製のファスト ゲル グラディエント (Phast Gel Gradient 8-25) に塗付し、最大電圧250V、最大電流10 mAにセットして泳動を開始させた。泳動終了後、クマシー染色と銀染色における挙動を観察した。

クマシー染色では、染色液としてファルマシア製の0.1%ファスト ゲル ブルー (Phast Gel Blue) Rを、脱色液として、メタノール：酢酸：蒸留水 (容量比3:1:6) 混液を使用し、次の順序で染色・脱色を行った。

- 1) 50℃で8分間染色
- 2) 50℃で5分間脱色
- 3) 50℃で8分間染色
- 4) 50℃で10分間脱色
- 5) 50℃で5分間保液 (グリセロール、酢酸、蒸留水の容量比5:10:85混液)

6) 乾燥

銀染色は、次の順序で行った。

- 1) 50℃で2分間、洗淨液(エタノール、酢酸、蒸留水の容量比5:1:4混液)で処理
- 2) 50℃で2分間、洗淨液(エタノール、酢酸、蒸留水の容量比10:5:85混液)で処理
- 3) 50℃で4分間、洗淨液(エタノール、酢酸、蒸留水の容量比10:5:85混液)で処理
- 4) 50℃で6分間、増感液(8.3%グルタルジアルデヒド)で処理
- 5) 50℃で3分間、洗淨液(エタノール、酢酸、蒸留水の容量比10:5:85混液)で処理
- 6) 50℃で5分間、洗淨液(エタノール、酢酸、蒸留水の容量比10:5:85混液)で処理
- 7) 50℃で2分間、洗淨液(脱イオン水)で処理
- 8) 50℃で2分間、洗淨液(脱イオン水)で処理
- 9) 40℃で13分間、0.25w/v%硝酸銀で処理
- 10) 30℃で30秒間、洗淨液(脱イオン水)で

PS(以下、LPS1と称す)は分子量3万付近にややまとまった染色帯を示した。菌体900814-2に由来するLPS(以下、LPS2と称す)は30,000から43,000の間に染色帯が認められるが、14,000以下の染色帯の染色度と比較すると、高分子のものは極めて少ないと推定される。糖量、ヘキシサミン量(後述する)からも、LPS2は最も糖含有率が低く、ついで、菌体900814-3に由来するLPS(以下、LPS3と称す)、LPS1の順に高くなり、電気泳動で観察されたパターンと一致すると考えられる。又、LPS量/総乾燥収量の比もLPS2、LPS3、LPS1の順に低くなっている。以上の観察結果から、LPS2は比較的低分子のLPSが多く、次いで、LPS3、LPS1の順にその割合は少なくなると推定される。

⑦リン含有量

チェン-トリバラ(Chen-Toribara)法【チェン等著、「アナリティカル ケミストリ(Analytical Chemistry

処理

- 11) 30℃で30秒間、洗淨液(脱イオン水)で処理
- 12) 30℃で30秒間、現像液(0.04v/v%ホルムアルデヒド+2.5w/v%炭酸ナトリウム洗淨液)で処理
- 13) 30℃で4分間、現像液(0.04v/v%ホルムアルデヒド+2.5w/v%炭酸ナトリウム洗淨液)で処理
- 14) 50℃で2分間、反応停止液(5%v/v%酢酸)で処理
- 15) 50℃で3分間、保護液(酢酸、グリセロール、蒸留水の容量比10:8:85混液)で処理
- 16) 乾燥

LPSは銀染色に染まるが、クマシー染色には染まらない性質を利用して染色帯を観察したら、添付図面1に示されるように、本発明の3種のLPSの主要染色帯は分子量5,000付近に認められた。又、菌体900814-1に由来するL

y)、vol. 28、1756~1758頁(1956年)に準拠して次の通りに行った。

LPS1、LPS2、LPS3を各別に蒸留水に溶解して、それぞれ、31.6μg、57.6μg、103.6μgのLPSを含む20μlの溶液を調製し、小試験管に入れた。20μlの50v/v%硫酸を添加し、160℃で2時間加熱した。次いで、20μlの10v/v%過塩素酸を添加した後にガスバーナーで1分間加熱して灰化させた。その後、0.5mlの蒸留水、次いで0.5mlの反応試薬(1mlの6N硫酸、2mlの蒸留水、2mlの2.5v/w%モリブデン酸アンモニウム及び1mlの10v/w%のアスコルビン酸を混合して調製し、その0.5mlを使用)を添加して室温で30分間放置した後、820nmでの吸光度(OD₈₂₀)を測定した。なお、検量線作成用の試料としては、リン酸二水素カリウム(和光純薬社製)を蒸留水で希釈し、リン酸重量としてそれぞれ2.5μg、1μg、0.25μg、0μgを含む0.5mlの溶液を

調製して使用した。なお、リン1gはリン酸二水素カリウム4.39gに相当する。結果を表4に示す。なお、吸光度を示す数値は、無菌リンの投入(例えば、リン酸緩衝液に由来する)による誤差を避けるために、加熱処理をしていない対照のデータを除いた値である。また、リン数(P数)は、分子量5,000当たりの換算数である。

表 4

LPS	吸光度	P量($\mu\text{g}/\mu\text{g}$)	P量(%)	P数
1	0.36	0.54(1/32)	1.7	2 \pm 1
2	0.31	0.46(1/58)	0.8	1 \sim 2
3	0.87	1.30(1/104)	1.3	2 \pm 1

$$P\text{量} = \text{吸光度} \div 0.67$$

④ ヘキソサミン含有量

エルソン-モルガン(Elson-Morg

(試薬A) 75 μL のアセチルアセトンと2.5mLの1.25N炭酸ナトリウムを混合して調製
(試薬B) 1.6gのp-ジメチルベンズアルデヒドと30mLの濃塩酸と30mLの96%エタノールを混合して調製

結果、LPS1、LPS2、LPS3のヘキソサミン数はそれぞれ9 \pm 1/分子量5,000、7 \pm 1/分子量5,000、5 \pm 1/分子量5,000だった。

⑤ KDO含有量

KDO(2-ケト-3-デオキシオクトネート)含有量をジフェニルアミン法[シャビール(Shaby R.) 等著、アナリティカルバイオケム(Analytical Biochem.), 58(1)、123 \sim 129頁(1974年)]に準拠して次の通りに行った。

500mgのジフェニルアミン、5mLのエタノール、45mLの水酢酸、50mLの濃塩酸(全て和光純薬社製)を合わせてKDO検出試薬を調製した。その500 μL に、(1)0.505mg

an)法(東京化学同人出版「生化学実験講座」No.4の377 \sim 378頁)に準拠して次の通りに行った。

LPSを蒸留水に溶解して1.58mg(LPS1)、2.88mg(LPS2)、5.18mg(LPS3)/mLの溶液を調製し、その100 μL をスクリュ-キャップ付きスピッツ(イワキガラス社製)に入れ、これに100 μL の8NHClを添加して110 $^{\circ}\text{C}$ で16時間加熱した。4NNaOHを約200 μL 添加してpH7とした。その100 μL を分取し、別のスクリュ-キャップ付きスピッツに入れ、200 μL の下記試薬Aを加えた後に、105 $^{\circ}\text{C}$ で1.5時間加熱し、次いで温水で冷却した。次いで、100 μL を分取し、570 μL の96%エタノールを加え、更に、57 μL の下記試薬Bを加えた後に室温で1時間放置し、535nmで吸光度を測定した。検量線作製用試料としては0.20 \sim 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のN-アセチルグルコサミン(和光純薬社製)を使用した。

/mLのLPS1を含む250 μL 蒸留水溶液;
(2)0.576mg/mLのLPS2を含む250 μL 蒸留水溶液;(3)0.518mg/mLのLPS3を含む250 μL 蒸留水溶液;のいずれかを合わせ、100 $^{\circ}\text{C}$ の沸騰水浴中で33分間加熱後に冷水(24.5 $^{\circ}\text{C}$)中で30分間冷却し、ついで日立分光光度計320を使って420、470、530、550nmでの紫外部吸収を測定した(それぞれA₄₂₀、A₄₇₀、A₅₃₀、A₅₅₀とする)。標準試料としては、0.5 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ のKDOアンモニウム塩[米国シグマ(Sigma)社製]を含む蒸留水250 μL を使用した。

検体試料、標準試料それぞれについて、次式の値を求めた。

$$S = A_{420} - A_{470} + A_{530} - A_{550}$$

検体試料の値(S_i)はLPS1で0.109、LPS2で0.078、LPS3で0.099であった。標準試料の値(S_s)は0.248であり、蒸留水のみは0.005であった。

この値の比較により、LPS1には2 \pm 1/分

子量5,000、LPS2には1~2/分子量5,000、LPS3には2±1/分子量5,000のKDDが含まれると推定された。

なお、これらの値は、LPS1を例にとると、次のように計算される。

溶液に含まれるKDDの濃度を x ($\mu\text{mol}/\text{ml}$)とすると、

$$\frac{0.5}{0.246} = \frac{x}{0.109} \quad \therefore x = 0.221$$

従って、LPS1の1モル(5,000と仮定)に含まれるKDDのモル数を y とすると、

$$y = x \times 10^{-3} \times \frac{5,000}{0.505 \times 10^{-3}} = 2.19$$

以下は、本発明のLPSを含む製剤の処方例である。なお、LPS量は、リムラステストによる大腸菌LPS換算量である。

実施例2 (錠剤)

LPS1 0.04g

実施例1

①各群2匹又は3匹のマウス(7週齢のオスC3H/He、平均体重25g)の尾静脈に、1匹当たりリムラス活性量で1、10、又は100 μg のLPS1、LPS2、LPS3を含む生理的食塩水0.2mlを注射し、その1時間後に血漿を採取し、L929細胞に対する毒性に基づいてTNF活性を測定した。結果を、各群2匹又は3匹の平均として次表5に示す。

表 5

検体	TNF活性 (単位/ml)		
	1 μg	10 μg	100 μg
LPS1	6.15(3)	25.80(2)	30.69(2)
LPS2	1.90(3)	7.47(2)	6.57(2)
LPS3	7.44(3)	16.19(2)	34.47(2)

6% HPC乳糖 178g

ステアリン酸タルク 8g

バレイショデンプン 14g

以上を混和し、打錠して、0.1mgの小麦LPSを含む0.5gの錠剤400個を調製した。

実施例3 (内服液剤)

LPS1 1mg

精製水 1000ml

実施例4 (軟膏剤)

LPS1 0.1g

精製ラノリン 80g

白色ワセリン 適量
1000g

実施例5 (注射剤)

LPS1 0.5mg

注射用蒸留水 適量

合計 1000ml

()内はマウスの匹数を表す。

投与量、投与間隔、毒性値

本発明のLPSを免疫機能活性化剤として、或いは、動物用免疫機能活性化剤抗糖尿病剤動物用抗糖尿病剤として投与するさいの量、投与間隔は、当然、担当医師或いは獣医師の厳重な管理下、投与対象の年齢、症状、体重、投与効果を勘案して個別に決定されるが、人間の成人(60kg)で、経口投与で1 μg ~100mg、静脈投与で10ng~1mg、経皮投与で100ng~1mgが1日1回の投与量の一応の目安となる。なお、動物では、牛、馬等の大型動物は上記の量の60分の1を体重1kg当たりの量の目安とし、豚、犬、猫等の中型、小型の動物ではその2倍量を体重1kg当たりの量の目安とし、鶏等の鳥類では更にその2倍量を体重1kg当たりの量の目安とし投与できる。

【発明の効果】

本発明により新規な細菌、それに由来する新規なLPS、及びそれを含む新規な免疫機能活性化剤、動物用免疫機能活性化剤が提供される。

又、本発明のLPSは、常法により容易に医薬、動物薬、検査薬、医薬部外品、化粧品、食品、機能性食品、飲料、飼料その他の主成分として或は一成分として配合することができる。

4 図面の簡単な説明

第1図は、本発明のLPSの、SDS電気泳動におけるパターンを示す図である。

図中、1はLPS1の、2はLPS2の、3はLPS3のパターンを示す。

特許出願人 千葉製粉株式会社

代表者 須藤 俊彌 (ほか2名)

第1図

94,000 •
67,000 •
43,000 •

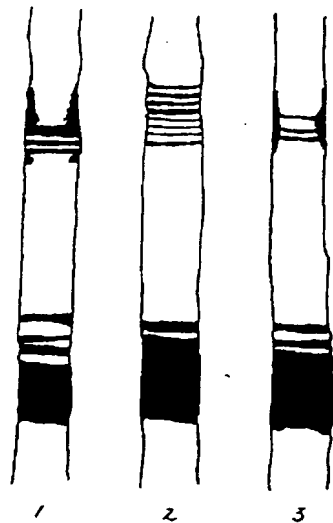
30,000 •

20,000 •
17,000 •

15,000 •
14,000 •

8,200 •
6,400 •
5,600 •

2,600 •



受託番号変更届

平成3年8月20日

特許庁長官 深沢 亘 殿

1. 事件の表示 平成2年特許第218599号
2. 発明の名称 新規細菌、新規LPS、新規免疫増進活性化剤、新規動物用免疫増進活性化剤
3. 手続をした者

事件との関係	代表出願人
郵便番号	260
住所	千葉県千葉市新港17番地
氏名	千葉製粉株式会社
	代表者 須藤 俊彌
4. 旧寄託機関の名称 通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所
5. 旧受託番号 微工研第11064号
6. 新寄託機関の名称 通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所
7. 新受託番号 微工研第8509号
8. 旧寄託機関の名称 通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所
9. 旧受託番号 微工研第11065号
10. 新寄託機関の名称 通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所
11. 新受託番号 微工研第3510号
12. 旧寄託機関の名称 通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所
13. 旧受託番号 微工研第11066号
14. 新寄託機関の名称 通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所
15. 新受託番号 微工研第3511号
16. 添付書類の目録

新受託番号を証明する書面

方式
審査



3通

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.
**As rescanning these documents will not correct the image
problems checked, please do not report these problems to
the IFW Image Problem Mailbox.**